正交试验法确定测定意大利蜜蜂头部乙酰胆碱酯酶反应的最佳条件

张　莹[1,2], 黄　建[1], 高希武[2*]

(1. 福建农林大学植物保护学院, 福州　350002; 2. 中国农业大学昆虫学系, 北京　100094)

摘要: 用正交试验法研究了酶浓度、底物浓度、反应体系的 pH 值、反应温度和反应时间 5 个因素对测定意大利蜜蜂 *Apis mellifera ligustica* Spinola 头部乙酰胆碱酯酶(AChE)活性的影响, 并从试验组合中选出最佳条件。蜜蜂 AChE 活性的测定采用 Gorun(1978)改进的 Ellman 方法, 以碘化硫代乙酰胆碱(ATCI)为底物, 5, 5′-二硫双硝基苯甲酸(DTNB)为显色剂, 测定反应物在 412 nm 波长下的光密度值, 用考马斯亮蓝 G-250 法测定蛋白质含量, 经计算得到蜜蜂头部 AChE 的比活力。对正交试验结果进行极差分析和方差分析, 结果表明各因素对实验结果影响的大小顺序为 温度 > pH 值 > 时间 > 酶浓度 > 底物浓度。并得出测定蜜蜂头部 AChE 活性的最佳条件是 酶终浓度 0.2 头/mL、底物终浓度 0.8 mmol/L、pH 值 7.5、温度 40℃及反应时间 5 min。

关键词: 蜜蜂; 乙酰胆碱酯酶; 正交试验; 方差分析; 最佳条件

中图分类号: Q965.9　　**文献标识码**: A　　**文章编号**: 0454-6296(2005)04-0627-06

The optimization of conditions for assaying activity of acetylcholinesterase from the Italian honeybee (*Apis mellifera ligustica* Spinola) by orthogonal matrix method

ZHANG Ying[1,2], HUANG Jian[1], GAO Xi-Wu[2*] (1. College of Plant Protection, Fujian Agricultural and Forestry University, Fuzhou 350002, China; 2. Department of Entomology, China Agricultural University, Beijing 100094, China)

Abstract: The optimal conditions of assaying the activity of acetylcholinesterase (AChE) from the Italian honeybee (*Apis mellifera ligustica* Spinola) heads were determined by orthogonal matrix method. The concentrations of acetylcholinesterase and substrate, pH and temperature of the reaction system, and reaction time were optimized. $L_{25}(5^6)$ orthogonal matrix was adopted, without considering interaction. The specific activity of AChE was determined by colorimetric method of Ellman modified by Gorun (1978), using acetylthiocholine iodide (ATCI) as substrate and DTNB (5, 5′-dithio-bis-2-nitrobenzoic acid) as chromogen. The optical density was measured by spectrophotometric detection (at 412 nm) of the increase of yellow color produced from thiocholine when reacted with 5, 5′-dithio-bis-2-nitrobenzoate ions. Protein concentrations in homogenate supernatants were determined by the method of Bradford (1976). The results revealed that temperature of the reaction system was the most important factor for measuring the activity of AChE from honeybee heads, and the measuring was also remarkably affected by the other four factors. The effects on the activity of acetylcholinesterase were in the order of temperature > pH > time > concentration of AChE > concentration of substrate. The optimal conditions were: 0.2 heads/mL, 0.8 mmol/L substrate, pH 7.5, 40℃, 5 minutes.

Key words: *Apis mellifera ligustica*; acetylcholinesterase; orthogonal experiment; variance analysis; optimal conditions

意大利蜜蜂 *Apis mellifera ligustica* Spinola 是一种世界性的经济昆虫, 它不仅生产大量产品供人类享用, 而且在访花的过程中为植物授粉, 提高了植物的结实率, 对农作物更起到了提高品质、增加产量的作用(Colzoni and Speranza, 1998; 方兵兵, 2001)。

蜜蜂对大多数农药敏感度较高(余林生和孟祥金, 1989)。蜜蜂农药中毒是全球养蜂业广泛存在

基金项目: 国家重点基础研究发展规划'973'项目(G200016207); 国家自然科学基金项目(30170621, 39970496)

作者简介: 张莹, 女, 1972 年生, 满族, 原籍河南, 博士研究生, 主要从事蜜蜂毒理及蜜蜂病理方面的研究, E-mail: yy7232@163.com

* 通讯作者 Author for correspondence, E-mail: gaoxiwu@263.net.cn

收稿日期 Received: 2004-08-18; 接受日期 Accepted: 2004-11-08

的一大问题(余林生和孟祥金,1997;李位三和王启发,2002)。我国是世界养蜂和蜂蜜生产、出口的第一大国,目前的蜂群饲养量达 700 多万群,占世界蜂群数的 1/10 以上(http://www.cnzjqi.com/wto-tbt/mag/m7.html)。但我国养蜂业的生产模式使蜂群易受到农药的影响。

我国用于防治农作物害虫及杀灭卫生害虫的杀虫剂以有机磷和氨基甲酸酯类为主(林荣寿等,1994)。这两类农药使昆虫中毒致死的主要机理是抑制了神经系统中的乙酰胆碱酯酶(acetylcholinesterase, AChE, EC3.1.1.7)(Corbett *et al*., 1984)。为了能有效地控制蜜蜂中毒、培育对农药高抗的蜜蜂品种及利用蜜蜂监测评价环境质量等,有必要系统化地研究蜜蜂体内有机磷及氨基甲酸酯类杀虫剂的靶标酶乙酰胆碱酯酶的性质。

正交试验法是根据组合理论,按照一定规律构成表格即正交表,以正交表为工具安排实验方案,用统计数学原理进行数据分析、处理实验结果(李松岗,2002)。作为多因素分析的一种设计,此方法可以起到简化实验的作用。我们采用正交试验设计研究了多个变量对测定蜜蜂头部乙酰胆碱酯酶活性的影响,并找出最佳测定条件的组合,为今后进一步研究提供了依据。

1 材料和方法

1.1 供试虫源

意大利蜜蜂成年工蜂由中国农业大学昆虫学系昆虫行为研究室提供。

1.2 仪器设备和化学试剂

高速冷冻离心机,日本 Hitachi Koki 公司产品;紫外-可见分光光度仪(PE 40),美国 PE 公司产品;电子天平(Sartorius 2004 MP),Opton 公司产品。

碘化硫代乙酰胆碱(acetylthiocholine iodide, ATCI)为 Fluka 公司产品;5,5′-二硫双硝基苯甲酸(5,5′-dithio-bis-2-nitrobenzoic acid, DTNB)为 Roth 公司产品;考马斯亮蓝 G-250,英国进口分装,中国医药公司北京采购供应站经销;其他试剂均为国产分析纯。

1.3 酶液制备

取新鲜蜜蜂头部或者贮存在 -84℃下的蜜蜂头部,按 2 头/mL 在预冷的不同 pH 值的 0.1 mol/L 磷酸缓冲液(含 0.1% Triton X-100)中冰浴匀浆。匀浆液在 4℃,15 000×g 离心 20 min。取上清液作为酶源。

1.4 乙酰胆碱酯酶(AChE)活性测定

采用 Gorun(1978)改进的 Ellman 方法(高希武,1987)。取待测酶液 0.1 mL 与 0.1 mL ATCI 混匀,在不同处理组合下水浴反应一定时间后加入 0.9 mL 显色剂(DTNB)并终止反应,在 412 nm 处测定光密度(OD)值(消光系数 $\varepsilon = 13.6$,光程 $L = 1$ cm)。

乙酰胆碱酯酶的比活力(μmol·min^{-1}·mg^{-1}) = $\dfrac{\Delta OD/mg \times V}{\varepsilon \times L}$

1.5 蛋白质含量测定

参照 Bradford(1976)考马斯亮蓝 G-250 法。用牛血清白蛋白(BSA)测定蛋白质含量标准曲线。取 1 mL 待测酶液(调整蛋白质含量 20~100 μg),加 5 mL 考马斯亮蓝 G-250 染色液,混合均匀后 2 min 至 1 h 内测 $OD_{595\ nm}$值。由标准曲线计算酶液中蛋白质的含量。

1.6 正交试验设计

本实验中研究的因素是影响酶促反应的一些主要因素,如酶浓度、底物浓度、反应体系的酸碱度、反应温度及反应时间等(表 1),采用的正交表为 $L_{25}(5^6)$。

表 1 正交试验中的影响因素及水平

Table 1 Experimental factors and their levels for orthogonal projects

水平 Level	酶浓度(heads/mL) Concentration of AChE (A)	底物浓度(mmol/L) Concentration of substrate (B)	pH (C)	温度(℃) Temperature (D)	反应时间(min) Reaction time (E)
1	0.2	0.6	6.0	20	5
2	0.4	0.7	6.5	25	10
3	0.6	0.8	7.0	30	15
4	0.8	0.9	7.5	35	20
5	1.0	1.0	8.0	40	25

注:1、2、3、4 和 5 分别表示各因素的 5 个水平;A、B、C、D 和 E 分别表示酶浓度、底物浓度、pH、温度和反应时间,下同。
Notes: Numerals 1, 2, 3, 4, and 5 represent 5 levels of factors; letters A, B, C, D, and E represent factors of concentration of AChE, concentration of the substrate, pH, reaction temperature and reaction time, respectively, and the same below.

1.7 蜜蜂头部 AChE 比活力

按正交表 $L_{25}(5^6)$ 所列 25 个处理组合进行实验，反应结束后测定光密度值并计算蜜蜂头部 AChE 比活力，每个处理重复 3 次，每次重复测定 3 次。

2 结果与分析

2.1 蜜蜂头部 AChE 的比活力

蜜蜂头部 AChE 比活力的测定及计算结果见表 2。

表 2 蜜蜂头部乙酰胆碱酯酶不同处理组合的比活力值

Table 2 Application of $L_{25}(5^6)$ orthogonal projects in assaying the acetylcholinesterase activity from the Italian honeybee *Apis mellifera ligustica* heads

编号 Run	处理组合 Combination of treatment	乙酰胆碱酯酶比活力 (μmol·min^{-1}·mg^{-1}) Specific activity of AChE
1	$A_1B_1C_1D_1E_1$	0.0829 ± 0.0066
2	$A_1B_2C_2D_2E_2$	0.0812 ± 0.0155
3	$A_1B_3C_3D_3E_3$	0.1569 ± 0.0369
4	$A_1B_4C_4D_4E_4$	0.1942 ± 0.0633
5	$A_1B_5C_5D_5E_5$	0.2493 ± 0.0518
6	$A_2B_1C_2D_3E_4$	0.0741 ± 0.0169
7	$A_2B_2C_3D_4E_5$	0.1320 ± 0.0309
8	$A_2B_3C_4D_5E_1$	0.2979 ± 0.1136
9	$A_2B_4C_5D_1E_2$	0.1413 ± 0.0312
10	$A_2B_5C_1D_2E_3$	0.0588 ± 0.0040
11	$A_3B_1C_3D_5E_2$	0.1767 ± 0.0406
12	$A_3B_2C_4D_1E_3$	0.0871 ± 0.0345
13	$A_3B_3C_5D_2E_4$	0.0990 ± 0.0291
14	$A_3B_4C_1D_3E_5$	0.0622 ± 0.0059
15	$A_3B_5C_2D_4E_1$	0.1483 ± 0.0294
16	$A_4B_1C_4D_2E_5$	0.0528 ± 0.0162
17	$A_4B_2C_5D_3E_1$	0.1824 ± 0.0474
18	$A_4B_3C_1D_4E_2$	0.0986 ± 0.0050
19	$A_4B_4C_2D_5E_3$	0.1166 ± 0.0279
20	$A_4B_5C_3D_1E_4$	0.0711 ± 0.0147
21	$A_5B_1C_5D_4E_3$	0.0563 ± 0.0261
22	$A_5B_2C_1D_5E_4$	0.0946 ± 0.0054
23	$A_5B_3C_2D_1E_5$	0.0430 ± 0.0094
24	$A_5B_4C_3D_2E_1$	0.1332 ± 0.0259
25	$A_5B_5C_4D_3E_2$	0.1204 ± 0.0429

注：按 $L_{25}(5^6)$ 正交表安排的 25 个处理组合进行实验，下角标代表各因素的不同水平。每个处理重复 3 次，每个重复测定 3 次。表中数据为平均值 ± 标准差。

Notes: The arrangements of A, B, C, D and E were decided by orthogonal design for 5 (factor) × 25 (run number); every row of run number represents one experimental replicate, every run was replicated three times and every replicate was measured three times. Values were mean ± *SD*.

2.2 正交试验结果的极差分析

表 3 是对表 2 的数据进行极差分析的结果，从中得出各因素对蜜蜂头部 AChE 比活力测定影响的大小顺序为 温度 > 时间 > pH 值 > 酶浓度 > 底物浓度。其中反应温度的极差最大，表明该因素对测定蜜蜂头部 AChE 比活力的影响最大。

应用极差分析的结果可以得出各因素的最优水平，直观分析结果见图 1。A 因素的最优水平是 1，即酶的浓度为 0.2 头/mL；B 因素的最优水平是 3，即底物的浓度为 0.8 mmol/ L；C 因素的最优水平是 4，即反应体系的 pH 值为 7.5；D 因素的最优水平是 5，即反应温度是 40℃；E 因素的最佳水平是 1，即反应时间为 5 min。

表 3 $L_{25}(5^6)$ 正交试验极差分析表

Table 3 Analysis of the results from orthogonal projects with the method of range analysis

	乙酰胆碱酯酶比活力 Specific activity of AChE (μmol·min^{-1}·mg^{-1})				
	A	B	C	D	E
K_1	2.2935	1.3284	1.1914	1.2762	2.5341
K_2	2.1122	1.7320	1.3896	1.2751	1.8547
K_3	1.7197	2.0863	2.0096	1.7881	1.4269
K_4	1.5645	1.9423	2.2570	1.8879	1.5990
K_5	1.3427	1.9436	2.1850	2.8053	1.6179
k_1	0.1529	0.0886	0.0794	0.0851	0.1689
k_2	0.1408	0.1155	0.0926	0.0850	0.1236
k_3	0.1146	0.1391	0.1340	0.1192	0.0951
k_4	0.1043	0.1295	0.1505	0.1259	0.1066
k_5	0.0895	0.1296	0.1457	0.1870	0.1079
R 值	0.0634	0.0505	0.0710	0.1020	0.0738
最佳水平 Optimal level	1	3	4	5	1

注：K_i 代表各因素 i 水平下比活力值的和；k_i 代表 K_i 的平均值。

Notes: K_i is the sum of the specific activity of AChE of the i level of different factors, and k_i represents the average of K_i.

2.3 正交试验结果的方差分析

正交试验结果的极差分析较为简便，得出的结论比较直观。但是因为计算比较粗放，不能给出误差大小的估计，因而进一步对实验结果进行方差分析。方差分析的结果见表 4。从表 4 可以看出，5 个因素对蜜蜂头部 AChE 比活力的测定都有显著影响。除底物浓度外的其余各因素，即酶浓度、pH 值、反应温度和反应时间均对测定有极显著影响。其影响大小顺序为 温度 > pH > 时间 > 酶浓度 > 底物浓度。由方差分析得出的影响大小顺序与用极差

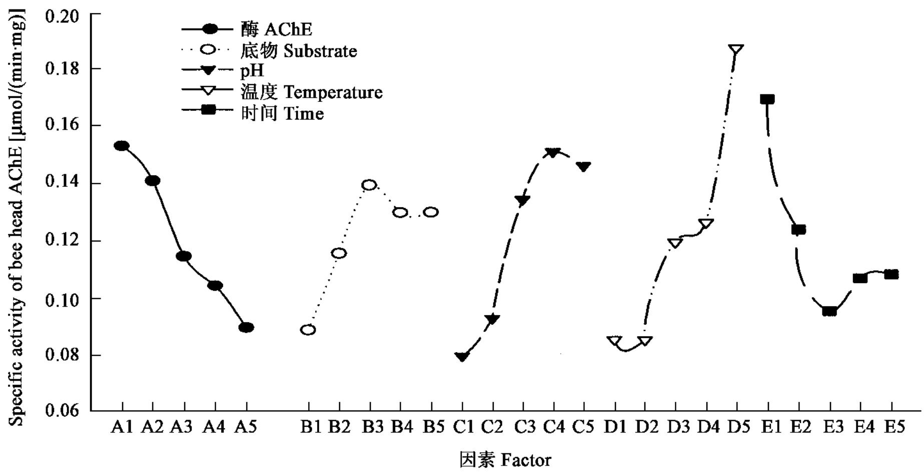


图 1 正交试验的 5 个因素与蜜蜂头部乙酰胆碱酯酶比活力关系图

Fig. 1 Intuitive analysis of the relationship between 5 factors and the acetylcholinesterase activity from the Italian honeybee *Apis mellifera ligustica* heads

表 4 $L_{25}(5^6)$ 正交试验方差分析表

Table 4 Analysis of the results from orthogonal projects with ANVOA

变异来源 Source of variation	*SS* (平方和) Sum of square	*df* (自由度) Degree of freedom	*MS* (均方) Mean square	*F*
A	0.0408	4	0.0102	5.0210**
B	0.0233	4	0.0058	2.8686*
C	0.0626	4	0.0157	7.7088**
D	0.1045	4	0.0261	12.8656**
E	0.0503	4	0.0126	6.1896**
合并误差 Consolidated error	0.1097	54	0.0020	

注：为提高试验分析的精度，将 *F* 值不显著的重复间和空列两项合并到误差项中，表中所列合并误差即为 3 项的合并值。“ * ”和“ ** ”分别表示差异显著($P \leqslant 0.05$)和极显著($P \leqslant 0.01$)。

Notes: In order to improve the accuracy of the analysis, errors of replicate and bland row were consolidated into the error item. “ * ” and “ ** ” represent significant difference ($P \leqslant 0.05$) and extremely significant difference ($P \leqslant 0.01$), respectively.

分析得出的结果稍有不同。在极差分析的结果中，时间对酶比活力测定的影响高于 pH 值，而方差分析得出的结果与其相反。鉴于方差分析能准确地估计误差，并在合并误差后提高了检验的精确性，因而以方差分析得出的结论为准。即在影响蜜蜂头部 AChE 比活力测定的因素中，反应温度为最重要的影响因素，其余依次为反应体系的 pH 值、反应时间、酶浓度及底物浓度。

2.4 试验因素各水平间的多重比较

由于经 *F* 检验 5 个因素均达到显著或极显著水平，因此需要进行因素各水平的差异显著性检验，以便从中选出测定蜜蜂头部 AChE 比活力的最佳条件组合。本实验采用 Duncan(新复极差)法进行多重比较，结果见表 5。

酶浓度第 1 水平与第 2 水平差异不显著，与其余水平差异均显著，并且与第 4、第 5 水平差异极显著；第 2 水平与第 3 水平差异不显著，与第 4、第 5 水平差异极显著；第 3、第 4、第 5 水平间差异不显著。底物浓度第 3、4、5 水平与第 1 水平间差异极显著，它们之间以及与第 2 水平之间差异均不显著。pH 值第 3、4、5 水平与第 1、第 2 水平之间差异显著，其中第 4、第 5 水平差异极显著，第 3 水平与第 1 水平差异也极显著；温度的第 5 个水平与其他水平之间的差异极显著，第 3、第 4 水平与第 1、第 2 水平之间差异显著，其他温度之间差异不显著；时间的第 1 个水平与其他水平之间差异极显著，而其他各水平

之间差异不显著。

综合极差分析及方差分析的结果，5 个因素对测定蜜蜂头部 AChE 的比活力均有影响，因此在测定时都要加以控制。选择各因素的最优水平，可以得到测定蜜蜂头部 AChE 活性时的最佳条件组合：酶终浓度为 0.2 头/mL；底物终浓度为 0.8 mmol/L；pH 值 7.5；温度 40℃；时间 5 min。这时测定蜜蜂头部 AChE 的比活力灵敏度最高，比活力值最大。

表 5　正交试验的 5 个影响因素各水平的差异显著性检验（*SSR* 检验）

Table 5　Multiple comparison in five factors with the method of Duncan (*SSR* test)

水平 Level	乙酰胆碱酯酶比活力 Specific activity of AChE ($\mu mol \cdot min^{-1} \cdot mg^{-1}$)				
	A	B	C	D	E
1	0.1529 a A	0.0886 b B	0.0794 b C	0.0851 c B	0.1689 a A
2	0.1408 ab A	0.1155 ab AB	0.0926 b BC	0.0850 c B	0.1236 b B
3	0.1146 bc AB	0.1391 a A	0.1340 a AB	0.1192 b B	0.0951 b B
4	0.1043 c B	0.1295 a A	0.1505 a A	0.1259 b B	0.1066 b B
5	0.0895 c B	0.1296 a A	0.1457 a A	0.1870 a A	0.1079 b B

注：表中显示的多重比较结果为纵向排列，比较的是同一因素不同水平的差异显著性。不同小写字母和大写字母分别表示差异显著（$P \leqslant 0.05$）和极显著（$P \leqslant 0.01$）。

Notes: The results of multiple comparison were arranged in columns to compare the difference of five levels of one factor. Means within a column followed by the different small letters and capital letters are significantly different ($P \leqslant 0.05$) and extremely significantly different ($P \leqslant 0.01$), respectively.

3　讨论

源自不同种或取自一个生物体的不同组织的一种酶，其活性测定的最适条件经常会变化。最通常改变的是最适 pH 值、底物浓度及温度（Thompson，1999）。因此在进行蜜蜂头部 AChE 研究前必须确定测定的最适条件。

在测定蜜蜂头部 AChE 前，如果样品需要短期保存，例如短途运输时应将头部样品冷冻，以减少酶活性的丧失。在分析前若要较长时间的保存，应当尽可能把头部保存在不高于 -20℃ 的条件下（Hill，1989）。本实验中将意蜂成年工蜂的新鲜样品直接取头部测定其 AChE 的活性，或将新鲜样品贮存在 -84℃ 的超低温冰箱内，测定时取头部匀浆，2 种方法得出的结果无差异。因此在进行蜜蜂头部 AChE 活性测定时这 2 种方法均可采用。

据报道意蜂头部 AChE 有亲水及两性分子 2 种截然不同的类型，分别代表整个头部 AChE 活性的 3% ~ 7% 以及 93% ~ 97%（Kreissl and Bicker，1989）。本实验所测定的是蜜蜂头部总 AChE 的活性，因此在测定前先要将膜结合的 AChE 活性溶解下来，最方便的方法就是用中性的表面活性剂洗涤剂，例如 Triton X-100（Thompson，1999）。

有研究认为采集蜂脑部 AChE 的催化活性显著低于哺育蜂的（Belzunces and Colin，1991），而尚未见到有关不同年龄段的采集蜂之间头部 AChE 的活性是否有差异的报道。本研究中没有区别所用的意蜂成年工蜂的年龄，但就实验的结果来看并没有显著差异。测定的 AChE 比活力的差异是由于处理的不同而造成的。但也不能排除不同年龄段的蜜蜂之间头部 AChE 的活性有差异，这还有待于进一步的研究来证实。

本研究首次应用正交试验法确定了蜜蜂头部 AChE 反应的最佳条件，为今后对蜜蜂 AChE 的研究奠定了基础。AChE 有底物过量抑制的报道，因此明确测定时合适的底物浓度是非常重要的（Fairbrother *et al*.，1991）。酶浓度在保证测定灵敏度的前提下应尽可能减少蜜蜂头部的用量。许多物种的 AChE 最适 pH 值都是在 8.0 左右，如果 pH 高于 8.0，用于测定的试剂 DTNB 就会发生自发的水解（Thompson，1999）。测定时控制温度的重要性是因为所有酶的催化活性都是依赖于温度的，而温度既能使酶反应速度加快，也能使酶蛋白变性，因此最适温度是二者的平衡点。不同的酶或不同来源的同一种酶，平衡点会不同。设定反应时间这个因素也是希望在测定蜜蜂头部 AChE 的活性时能既灵敏又快捷地得出准确的结果。通过本实验也可以看出，正交试验法是解决多因素、多水平、有误差的一类实验问题的有效方法。

参 考 文 献（References）

Belzunces LP，Colin ME，1991. Differential response of *Apis mellifera* acetylcholinesterase towards pirimicarb. *NeuroReport*，2(5)：265 - 268.

Bradford MM，1976. A rapid and sensitive method for the quantitation of

microgram quantities of protein utilizing the principle of protein dye binding. *Anal. Biochem.*, 72:248-254.

Colzoni GL, Speranza A, 1998. Insect controlled pollination in Japanese plum (*Prunus salicina* Lindl.). *Scientia Horticulturea*, 72(3-4): 227-237.

Corbett JR, Wright K, Baillie AC, 1984. The Biochemical Mode of Action of Pesticides. New York: Academic Press. 99-140.

Fairbrother A, Marden BT, Bennettt JK, Hooper MJ, 1991. Methods used in the determination of cholinesterase activity. In: Mineau P ed. Cholinesterase-Inhibiting Insecticides. Amsterdam: Elsevier. 35-71.

Fang BB, 2001. The value of pollination of American honeybee for crops in 2000. *Apiculture of China*, 52(2):39-40. [方兵兵, 2001. 2000 年美国蜜蜂为农作物授粉的价值. 中国养蜂, 52(2):39-40]

Gao XW, 1987. Introduction of Ellman procedure for assay of cholinesterases in crude enzymatic preparations modified by Gorun. *Entomological Knowledge*, 24(4):245-246. [高希武, 1987. Gorun 等改进的 Ellman 胆碱酯酶活性测定方法介绍. 昆虫知识, 24(4):245-246]

Hill EF, 1989. Divergent effects of postmortem ambient temperature on organophosphorus and carbamate inhibited brain cholinesterase activity in birds. *Pestic. Biochem. Physiol.*, 33:264-275.

Kreissl S, Bicker G, 1989. Histochemistry of acetylcholinesterase and immunocytochemistry of an acetylcholine receptor-like antigen in the brain of the honeybee. *Journal of Comparative Neurology*, 286:71-84.

Li SG, 2002. Practical Biostatistics. Beijing: Peking University Publishing House. 304-315. [李松岗, 2002. 实用生物统计. 北京:北京大学出版社. 304-315]

Li WS, Wang QF, 2002. Analysis of the negative effect for employing pesticides in florescence. *Apiculture Technology*, (6):6-7. [李位三, 王启发, 2002. 作物花期喷施农药的负效应分析. 养蜂科技, (6):6-7]

Lin RS, Liang GM, Gao LM, 1994. Present situation of pesticides usage in China. *Chinese Journal of Pesticides*, 33(1):9-13. [林荣寿, 梁桂梅, 高立明, 1994. 我国农药使用现状. 农药, 33(1):9-13]

Thompson HM, 1999. Esterases as markers of exposure to organophosphates and carbamates. *Ecotoxicology*, 8:369-384.

Yu LS, Meng XJ, 1989. Relationship between employing pesticides and keeping honeybee in field land. *Apiculture Technology*, (3):12-13, 22. [余林生, 孟祥金, 1989. 大田使用农药与放蜂的关系. 养蜂科技, (3):12-13, 22]

Yu LS, Meng XJ, 1997. Studies and experiments on pesticides toxicity to honeybee. *Journal of Bee*, (1):4-6. [余林生, 孟祥金, 1997. 农药对蜜蜂毒性的试验与研究. 蜜蜂杂志, (1):4-6]

(责任编辑:黄玲巧)